

**Prasyarat ecolabel – Bagian 1: Cara uji  
senyawa bersifat bioakumulatif dengan  
penetapan koefisien partisi oktanol-air secara  
Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi  
(*High Performance Liquid Chromatography/HPLC*)**





© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi .....	i
Prakata.....	iii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi.....	1
4 Cara uji.....	1
5 Jaminan mutu dan pengendalian mutu .....	4
6 Rekomendasi .....	5
Bibliografi .....	7
 Tabel 1 Daftar senyawa standar yang direkomendasikan .....	 5





## Prakata

SNI 7228.1:2011 dengan judul *Prasyarat ecolabel – Bagian 1: Cara uji senyawa bersifat bioakumulatif dengan penetapan koefisien partisi oktanol-air secara Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (High Performance Liquid Chromatography/ HPLC)* digunakan untuk menentukan sifat bioakumulatif suatu bahan atau senyawa dengan penetapan koefisien partisi oktanol-air secara kromatografi cairan kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Selain itu dalam upaya mendukung persyaratan ecolabel kategori produk kertas cetak tanpa salut, maka dibuatlah Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk pengujian parameter-parameter tersebut.

Metode ini menggunakan referensi dari metode standar internasional yaitu OECD 117: *Guidelines for the testing of chemicals*, 2004. Metode ini telah melalui uji coba di laboratorium pengujian dalam rangka validasi metode serta dikonsensuskan oleh Sub Panitia Teknis 13-03-S1, *Kualitas Air* dari Panitia Teknis 13-03, *Kualitas Lingkungan dan Manajemen Lingkungan* dengan pihak terkait.

Standar ini telah disepakati dan disetujui dalam rapat konsensus dengan peserta rapat yang mewakili produsen, konsumen, ilmuwan, instansi teknis dan pemerintah terkait pada tanggal 28 Juni 2006 di Serpong. SNI ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 15 Maret 2007 sampai dengan 15 Juni 2007. Kemudian dilanjutkan dengan tahap pemungutan suara pada tanggal 18 Januari 2010 sampai dengan 18 April 2010, dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.



## Prasyarat ekolabel – Bagian 1: Cara uji senyawa bersifat bioakumulatif dengan penetapan koefisien partisi oktanol-air secara Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography/HPLC*)

### 1 Ruang lingkup

Metoda pengujian ini digunakan untuk menentukan sifat bioakumulatif suatu bahan/senyawa dengan menetapkan koefisien partisi (n-oktanol/air) dengan kisaran nilai  $\log P_{ow}$  antara 0 - 6 secara Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (*HPLC*) dengan menggunakan detektor yang sesuai, untuk memperkirakan kemungkinan suatu zat kimia yang mengalami bioakumulasi pada jaringan makhluk hidup.

### 2 Acuan normatif

OECD 117-2004, *Guideline for testing of chemicals, Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.*

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1 bioakumulatif

sifat suatu bahan yang menyebabkan terkumpulnya bahan tersebut pada biota atau makhluk hidup lain dalam konsentrasi yang dapat menimbulkan efek yang mengganggu keseimbangan lingkungan

#### 3.2 gugus fungsi

penataan atom secara khas dalam senyawa organik sehingga mampu mencirikan reaksi kimia

#### 3.3 koefisien partisi (P)

perbandingan konsentrasi dalam keadaan setimbang suatu senyawa dalam sistem fase organik dan fasa air

#### 3.4

##### $P_{ow}$

suatu parameter kunci dalam mempelajari unsur kimia lingkungan yang berhubungan dengan bioakumulasi yang merupakan perbandingan konsentrasi dalam keadaan setimbang antara fasa oktanol dan fasa air

### 4 Cara uji

#### 4.1 Prinsip uji

Prinsip pemisahan senyawa organik pada kolom HPLC yang berupa fase balik (*reverse phase*) misalnya  $C_8$  atau  $C_{18}$  yang terikat pada silika.

Contoh uji diinjeksikan ke dalam kolom partisi dan dialirkan ke sepanjang kolom oleh fase gerak. Senyawa tersebut akan tertahan di dalam kolom tersebut berdasarkan koefisien



partisi hidrokarbon-air. Yang mana bagian senyawa yang bersifat hidrofilik akan terelusi lebih awal sedangkan yang bersifat lipofilik akan terelusi kemudian. Waktu retensi relatif terhadap senyawa yang tidak tertahan di dalam kolom didefinisikan sebagai faktor kapasitas  $k$ , yaitu :  $k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ , dimana  $t_R$  adalah waktu retensi senyawa yang diukur dan

$t_0$  adalah senyawa yang sangat polar. Dengan memplot  $\log \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$  dengan  $\log P_{ow}$  senyawa pembanding, maka akan didapati hubungan matematis  $\log P_{ow} = a + b \times \log \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$ , dimana  $a$  adalah *intercept* dan  $b$  adalah *slope*. Dengan memplot  $\log \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$  senyawa uji terhadap kurva diatas, maka dapat ditentukan harga  $\log P_{ow}$  senyawa uji.

## 4.2 Bahan

- air suling yang bebas organik;
- saringan membran berpori 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) HPLC grade;
- standar yang sesuai dengan contoh uji (minimal 3 macam standar); dan
- tiourea ( $\text{NH}_2\text{CSNH}_2$ ) atau formamida ( $\text{HCONH}_2$ ).

## 4.3 Peralatan

- peralatan HPLC;
- spektrofotometer UV-Vis dan IR;
- kolom yang sesuai dengan contoh uji dan fase gerak yang digunakan;
- saringan gelas yang dilengkapi dengan vakum;
- gelas erlenmeyer 1000 mL;
- pipet volum 10,0 mL dan 25,0 mL;
- gelas piala 50 mL; 100 mL dan 250 mL;
- botol semprot plastik 1000 mL;
- jarum suntik seukuran 1,0 mL;
- mikro pipet 100,0  $\mu\text{L}$  dan 1000,0  $\mu\text{L}$ ;
- timbangan analitik dengan ketelitian sampai dengan 0,0001 g;
- batang pengaduk; dan
- labu ukur 10,0 mL.

## 4.4 Persiapan contoh uji

- Untuk penentuan senyawa yang bersifat bioakumulatif, diperlukan larutan standar yang satu gugus fungsi (lihat tabel 1) dengan nilai  $\log P_{ow}$  satu di atas yang diperkirakan, mendekati dan satu dibawah yang diperkirakan.

**CATATAN** Lakukan pendugaan gugus fungsi secara kualitatif dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang tertentu atau menggunakan spektrofotometer infra merah.

- Senyawa yang akan diuji dan senyawa standar harus dapat larut dalam fase gerak pada konsentrasi tertentu. Bahan kimia pelarut merupakan campuran metanol-air dengan perbandingan 3 : 1 (v/v).
- Lakukan pengenceran terhadap contoh uji menggunakan pelarut yang sesuai (bila perlu).



- d) Saring larutan contoh uji menggunakan saringan membran berpori 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 Persiapan peralatan

##### Pengkondisian Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi (HPLC)

- Tempat pelarut harus dilengkapi dengan fasilitas untuk menghilangkan gas dan juga penyaring partikel.
- Pompa pelarut harus dibuat dari bahan yang tahan terhadap fasa gerak yang digunakan dengan kecepatan alir 1 mL/menit.
- Injektor harus dapat memasukkan zat ke dalam kolom dalam waktu yang sesingkat mungkin untuk menghindari terjadinya pelebaran puncak, mudah dipergunakan, mempunyai keberulangan yang tinggi (*reproducible*), dan dapat bekerja meskipun ada tekanan balik yang tinggi.
- Kolom umumnya digunakan partikel yang bersifat *porous* dan ukurannya kecil, sebelum digunakan perlu dievaluasi terlebih dahulu dengan larutan standar dan kondisi percobaan tertentu. Perubahan suhu kolom dipertahankan pada kisaran  $\pm 2^\circ\text{C}$ .
- Detektor ultra violet panjang gelombang 210 nm atau detektor lain yang sesuai.
- Pencatat (*recorder*) untuk analisa kualitatif dan kuantitatif dengan presisi yang lebih baik sering digunakan integrator sehingga hasil analisa dihitung dan dilaporkan dalam bentuk angka.

#### 4.6 Persiapan pengujian

##### 4.6.1 Pembuatan senyawa standar

- Timbang 0,100 g senyawa standar ke dalam labu ukur 10,0 mL.
- Larutkan secara sempurna dengan campuran metanol dan air (3:1) sampai tepat tanda tera.
- Saring larutan standar menggunakan saringan membran berpori 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### 4.6.2 Pembuatan larutan standar dengan variasi konsentrasi

- Dari tiga larutan standar yang berbeda, buat masing-masing lima variasi konsentrasi.
- Saring larutan standar menggunakan saringan membran berpori 0,45  $\mu\text{m}$ .

**CATATAN** Untuk mempermudah pengerjaan langkah 4.6.2, pengujian dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### 4.7 Prosedur

- Siapkan fasa gerak yang merupakan campuran metanol dan air dengan perbandingan 3 : 1 (volume/volume).
- Saring larutan fasa gerak dengan menggunakan saringan membran berpori 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Kocok dan diamkan larutan fasa gerak dengan maksud untuk menghilangkan udara dan tunggu sesaat hingga suhu larutan sesuai dengan suhu ruangan.
- Alirkan larutan ke dalam kolom dengan kecepatan 1 mL/menit.
- Injeksikan 20,0  $\mu\text{L}$  larutan tiourea atau formamida.
- Ukur waktu retensi ( $t_0$ ).
- Injeksikan 20,0  $\mu\text{L}$  larutan standar. Ulangi injeksi sebanyak 2 kali.
- Injeksikan contoh uji sebesar 20,0  $\mu\text{L}$ . Ulangi injeksi sebanyak 2 kali.
- Catat waktu retensi dari puncak-puncak pada kromatogram contoh, dan bandingkan dengan waktu retensi masing-masing puncak dari standar untuk keperluan analisa kualitatif.



#### 4.8 Pernyataan hasil

Rumus koefisien partisi oktanol/air yang menentukan faktor kapasitas k adalah sebagai berikut :

$$\log P_{ow} = a + b \times \log \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (1)$$

**Keterangan:**

a, b adalah koefisien regresi linear;  
 t<sub>R</sub> adalah waktu retensi senyawa uji;  
 t<sub>0</sub> adalah waktu retensi *tiourea*.

**CATATAN** Untuk campuran senyawa yang homolog (misalnya seri alkana), kromatogram akan terdiri dari beberapa puncak komponen. Perhitungan dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\log P_{ow} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\log P_{ow,1})(\%area_i)}{\sum_{i=1}^{i=n} \%area_i} \quad (2)$$

**Keterangan:**

n adalah jumlah *peak area*.

### 5 Jaminan mutu dan pengendalian mutu

#### 5.1 Jaminan mutu

- Gunakan bahan kimia berkualitas HPLC.
- Gunakan seluruh peralatan yang terbuat dari gelas.
- Gunakan seluruh peralatan yang bebas kontaminan.
- Gunakan alat ukur yang terkalibrasi atau terverifikasi.
- Gunakan larutan standar yang tetap konsentrasinya atau hindari perubahan konsentrasi.
- Dikerjakan oleh analis yang kompeten.

#### 5.2 Pengendalian mutu

- Linearitas kurva kalibrasi ( $r^2$ ) harus lebih besar atau sama dengan 0,95.
- Lakukan analisis blangko untuk kontrol.
- Lakukan analisis duplo untuk kontrol ketelitian analis. Perbedaan hasil pengukuran lebih kecil atau sama dengan 20 %.



## 6 Rekomendasi

Nilai  $P_{ow}$  untuk senyawa standar yang direkombinasikan dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

**Tabel 1 Daftar senyawa standar yang direkomendasikan**

No	Nomor CAS	Senyawa Acuan	Log Pow	pKa
1	78-93-3	2-Butanone (Methylethylketone)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acetylpyridine	0,5	
3	62-53-3	Aniline	0.9	
4	103-84-4	Acetanilide	1.0	
5	100-51-6	Benzyl alcohol	1.1	
6	150-76-5	4-Methoxyphenol	1.3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Phenoxyacetic acid	1.4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Phenol	1.5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrophenol	1.5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitrile	1.6	
11	140-29-4	Phenylacetone nitrile	1.6	
12	589-18-4	4- Methylbenzyl alcohol	1.6	
13	98-86-2	Acetophenone	1.7	
14	88-75-5	2-Nitrophenol	1.8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-Nitrobenzoic acid	1.8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Chloroaniline	1.8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzene	1.9	
18	104-54-1	Cinnamyl alcohol (Cinnamic alcohol)	1.9	
19	65-85-0	Benzoic acid	1.9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Cresol	1.9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Cinnamic acid	2.1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisole	2.1	
23	93-58-3	Methylbenzoat	2.1	
24	71-43-2	Benzene	2.1	
25	99-04-7	3- Methylbenzoic acid	2.4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Chlorophenol	2.4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichloromethylene	2.4	
28	1912-24-9	Atrazine	2.6	
29	93-89-0	Ethyl benzoate	2.6	
30	1194-65-6	2-6-Dichlorobenzonitrile	2.6	



Tabel 1 (lanjutan)

No	Nomor CAS	Senyawa Acuan	Log Pow	pKa
31	535-80-8	3-Chlorobenzoic acid	2.7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluene	2.7	
33	90-15-3	1-Naphthol	2.7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichloroaniline	2.8	
35	108-90-7	Chlorobenzene	2.8	
36	1746-13-0	Allyl phenyl ether	2.9	
37	108-86-1	Bromobenzene	3.0	
38	100-41-4	Ethylbenzene	3.2	
39	119-61-9	Benzophenone	3.2	
40	92-69-3	4-Phenylphenol	3.2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3.3	
42	106-46-7	1,4-Dichlorobenzene	3.4	
43	122-39-4	Diphenylamine	3.4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalene	3.6	
45	93-99-2	Phenyl benzoate	3.6	
46	98-82-8	Isopropylbenzene	3.7	
47	88-06-2	2,4,6-Trichlorophenol	3.7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphenyl	4.0	
49	120-51-4	Benzyl benzoate	4.0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sec-buthylphenol	4.1	
51	120-82-1	1,2,4- Trichlorobenzene	4.2	
52	143-07-7	Dodecanoic acid	4.2	
53	101-84-8	Diphenyleter	4.2	pKa = 5,3
54	85-01-8	Phenanthrene	4.5	
55	104-51-8	n-Butylbenzene	4.6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4.8	
57	3558-69-8	2,6-Diphenylpyridine	4.9	
58	206-44-0	Fluoranthene	5.1	
59	603-34-9	Triphenylamine	5.7	
60	50-29-3	DDT	6.5	

Sumber: OECD 117 guideline for testing of chemicals: Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.



## Bibliografi

ASTM E 1147 – 92 (Reapproved 1997) : *Standard Test Method for Partition Coefficient (N-Octanol/Water) Estimation by Liquid Chromatography*

OECD guidelines for the testing of chemicals: *Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.*

C.V. Eadsforth and P. Moser, (1983), *Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients*, *Chemosphere*, 12, 1459.

W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988), *Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method*, *Chemosphere*, 17, 361.

C.V. Eadsforth, (1986), *Application of Reserve H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient*, *Pesticide Science*, 17, 311.

H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, (1981), *Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients*, *Pesticide, Science*, 12, 219.

B. McDuffie, *Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography*, (1981), *Chemosphere*, 10, 73.

OECD Guideline for Testing of Chemicals – *Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances*, *Draft Test Guideline 122*, November 2000.

OSPAR (1995), *"Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995"*, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20-24 February 1995.

M. Thatsher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman, (1999), *An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0.3. August.*

E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998), *Partitioning of Chemicals, Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges*, *Environmental Modelling & Software Vol. 13*, pp. 529-537.

L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygard, (1980) *Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography, Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes*, *Chemosphere* 9, 683.

W.E Hammers, G.J.Meurs and C.L. De Ligny, (1982), *Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system*, *J. Chromatography*, 247, 1.



J.E. Haky and A.M. Young. (1984), *Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds*, J. liq. Chromatography, 7, 675.

S. Fujisawa and E. Masuhara, (1981), *Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography* Journal of Biomedical Materials Research, 15, 787.

C. Hansch and A. J. Leo, (1979), *Substituent Constant for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Willey, New York.

C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir, (1982), *Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity* – Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

R. F. Rekker, H.M. de Kort, (1979), *The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set*, Eur. J. Med. Chem – Chim, Ther, 14, 479.

G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczedy, (1980), *On determination of hold-up time in reserved-phase liquid chromatography*, J. Liq. Chromato. 3, 1669.



















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)